

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-506526

(43) 公表日 平成10年(1998) 6月30日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 9/127		A 6 1 K 9/127	L
35/76		35/76	
38/21		39/395	A
38/22			H
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平8-508479	(71) 出願人	ヘキスト、アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国フランクフルト、アム、 マイン (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成7年(1995) 8月25日	(72) 発明者	ゼトラツェック、ハンス-ハラルト ドイツ連邦共和国マールブルク、ゾンネン ハーク、3
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997) 2月26日	(72) 発明者	ボスレット、クラウス ドイツ連邦共和国マールブルク、アン、デ ル、ハウシュタット、64
(86) 国際出願番号	P C T / E P 9 5 / 0 3 3 7 0	(72) 発明者	ミュラー、ロルフ ドイツ連邦共和国マールブルク、ポイティ ールスシュトラーセ、8
(87) 国際公開番号	W O 9 6 / 0 6 9 4 0	(74) 代理人	弁理士 佐藤 一雄 (外2名)
(87) 国際公開日	平成8年(1996) 3月7日		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	9 4 1 7 3 6 6 . 3		
(32) 優先日	1994年8月26日		
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		
(31) 優先権主張番号	9 5 0 6 4 6 6 . 3		
(32) 優先日	1995年3月29日		
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		

(54) 【発明の名称】 内皮細胞に特異的な細胞サイクルに依存する活性化化合物を用いる腫瘍の遺伝子療法

(57) 【要約】

腫瘍の遺伝子治療のためのDNA配列を記載する。その本質的要素では、DNA配列は、活性化配列、プロモーターモジュールおよび活性物質の遺伝子からなっている。活性化配列は、細胞に特異的な方法で増殖する内皮細胞またはこれらの内皮細胞に隣接する細胞中で活性化される。この活性化は、細胞サイクルに特異的な方法でプロモーターモジュールによって制御される。活性物質は、脈管形成のインヒビターまたは細胞成長抑制または細胞毒性分子である。DNA配列をウイルスまたは非ウイルスベクターに挿入し、このベクターに活性化した内皮細胞に親和性を有するリガンドを補足する。

【特許請求の範囲】

1. 腫瘍疾患の予防または治療のための活性化合物であって、活性化配列と、プロモーターモジュールと、抗腫瘍物質をコードするDNA配列とからなるDNA構築物を含んでなる、活性化合物。

2. プロモーターモジュールがCDE-CHR-I_nr要素を有し、かつcdc25Cプロモーター領域（ヌクレオチド配列：GGCTGGCGGAAGGTTTGAATGGTCAACGCCTGCGGCTGTTGATATTCTTG）の位置 $\leq -20 \sim \geq +30$ を含んでなるものであり、ここで、CDEが細胞サイクル依存性要素（ヌクレオチド配列：TGGCGG）からなり、CHRが細胞サイクル遺伝子相同領域（ヌクレオチド配列：GTTTGAA）からなり、I_nrが開始部位（位置+1）および開始に重要な隣接配列を表すものである、請求の範囲第1項に記載の活性化合物。

3. 内皮細胞または増殖する内皮細胞の直近の細胞において形成される転写因子によって制御される活性化配列（プロモーター配列またはエンハンサー配列）を含んでなる、請求の範囲第1項に記載の活性化合物。

4. CMVプロモーター、CMVエンハンサーまたはSV40プロモーター、または

内皮グルコース-1-輸送体、エンドグリン、VEGFレセプター1または2、レセプターチロシンキナーゼt i l-1またはt i l-2、B61レセプター、B61リガンド、エンドセリン、特にエンドセリンBまたはエンドセリン1、マンノース-6-リン酸レセプター、IL-1 α またはIL-1 β 、IL-1レセプター、VCAM-1またはvon Willebrand因子、または

GATA-2のような結合部位が5'-TTATCT-3'である内皮細胞中で優先的または選択的に活性である転写因子のオリゴマー化した結合部位からな

る合成活性化配列、または

VEGFのプロモーター配列、またはVEGFのエンハンサー配列、またはc-SRCまたはv-SRCのcDNA配列であってVEGF遺伝子を制御するもの、または

マウス哺乳動物腫瘍ウイルスのプロモーター配列またはステロイドレセプターのプロモーター配列

を含んでなる、請求の範囲第3項に記載の活性化合物。

5. 抗腫瘍活性化合物のDNA配列が、

網膜芽細胞腫タンパク質 p 1 1 0、または p 1 0 7 および p 1 3 0 タンパク質、または

p 5 3 タンパク質、または

p 2 1 タンパク質、P 1 6 タンパク質または別のサイクリン依存性キナーゼ (c d K) インヒビター、または

G A D D 4 5 タンパク質、または

b a k タンパク質、または

脈管形成を阻害するタンパク質、または

細胞成長抑制効果を示すタンパク質、または

炎症を刺激するタンパク質、または

細胞成長抑制剤の前駆体を開裂して細胞成長抑制剤を形成する酵素

をコードするものである、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の活性化合物。

6. 網膜芽細胞腫タンパク質 (p R b / p 1 1 0) が、2 4 6、3 5 0、6 0 1、6 0 5、7 8 0、7 8 6、7 8 7、8 0 0 および 8 0 4 位のアミノ酸の置換の結果、リン酸化することができず、しかしながらアミノ酸 T h r - 2 4 6、S e r - 6 0 1、S e r - 6 0 5、S e r - 7 8 0、S e r - 7 8 6、S e r -

7 8 7 および S e r - 8 0 0 が A l a で置換されたもの、アミノ酸 T h r - 3 5 0 が A r g で置換されたものおよび S e r - 8 0 4 が G l u で置換されたもののよう、大型のT抗原との結合活性を喪失しないもの、または

p 1 0 7 タンパク質が、p R b / 1 1 0 と同様にして突然変異されたものである、

請求の範囲第5項に記載の活性化合物。

7. p 5 3 タンパク質が、セリン 3 9 2 を除去することによってC末端で切

断されたものである、請求の範囲第5項に記載の活性化合物。

8. 抗腫瘍物質が、プラスミノゲン活性化物質インヒビター1 (PAI-1)、PAI-2、PAI-3、アンギオスタチン、血小板因子4、TIMP-1、TIMP-2またはTIMP-3である、請求の範囲第1~4項のいずれか1項に記載の活性化合物。

9. 抗腫瘍物質が、ペルフォリン、グランチン、IL-2、IL-4、IL-12、インターフェロン、例えばIFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α またはTNF β 、オンコスタチンM、RANTES、MCAF、IL-8、MIP-1 α 、MIP-1 β 、NAP-2、IL-3、IL-5、LIF、IL-11またはIL-13である、請求の範囲第1~4項のいずれか1項に記載の活性化合物。

10. 抗腫瘍物質が免疫グロブリンのFc断片からなる融合タンパク質である、請求の範囲第9項に記載の活性化合物。

11. 抗腫瘍物質が酵素であり、この酵素が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ、ニトロレダクターゼ、 β -グルクロニダーゼ (特に、ヒト、植物または細菌性 β -グルクロニダーゼ)、カルボキシペプチダーゼ、(好ましくはシュドモナス由来のもの)、ラクタマーゼ (好ましくは、*Bacillus cereus* 由来のもの)、ピログルタメートアミノペプチダーゼ、D-アミノペプチダーゼ、オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ヒドロキシニトリルリアーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼまたはグリコシダーゼである、請求の範囲第1~11項のいずれか1項に記載の活性化合物。

12. 酵素のDNA配列の点突然変異の結果、リソソーム保存が減少され、細胞外分泌が増加された、請求の範囲第11項に記載の活性化合物。

13. 酵素のシグナル配列を非相同シグナル配列で置換して、細胞外分泌が向上された、請求の範囲第11項に記載の活性化合物。

14. 数個の同一または異なる抗腫瘍物質のDNA配列を含み、それぞれの場合に2個のDNA配列が互いに内部リボソームエントリー部位のDNA配列に

よって連結されてなる、請求の範囲第1～13項のいずれか1項に記載の活性化化合物。

15. ベクターに挿入された、請求の範囲第1～13項のいずれか1項に記載の活性化化合物。

16. ベクターがウイルスである、請求の範囲第15項に記載の活性化化合物。

17. ウイルスがレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、単純ヘルペスウイルス、またはワクシニアウイルスである、請求の範囲第16項に記載の活性化化合物。

18. プラスミドに挿入された、請求の範囲第1～14項のいずれか1項に記載の活性化化合物。

19. コロイド分散系で調製される、請求の範囲第15～18項のいずれか1項に記載の活性化化合物。

20. リボソームがコロイド分散系である、請求の範囲第19項に記載の活性化化合物。

21. ポリリシン／リガンドがコロイド分散系である、請求の範囲第20項に記載の活性化化合物。

22. 内皮細胞の膜構造に結合するリガンドが補足された、請求の範囲第15～21項のいずれか1項に記載の活性化化合物。

23. リガンドが、

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、またはその抗体断片であって、その可変ドメインによって、細胞膜に特異的に結合するものであるか、または

サイトカインまたは成長因子、またはその断片または構成配列であって、平滑筋細胞上のレセプターに結合するものであるか、または

SLeX、LFA-1、MAC-1、LECAM-1またはVLA-4のような付着分子

である、請求の範囲第22項に記載の活性化化合物。

24. 内皮細胞の膜構造が、マンノースのレセプター、IL-1または成長

因子、例えばPDGF、FGF、VEGFまたはTGF β である、請求の範囲第23項に記載の活性化合物。

25. 静脈内、動脈内または体腔内注射、組織中または組織間隙中への注射、または局所投与のための製剤とされた、請求の範囲第1～24項のいずれか1項に記載の活性化合物。

【発明の詳細な説明】

内皮細胞に特異的な細胞サイクルに依存する活性化化合物を用いる

腫瘍の遺伝子療法

技術分野

腫瘍の遺伝子治療のためのDNA配列が記載されている。その本質的要素では、DNA配列は、活性化配列、プロモーターモジュール、および活性物質の遺伝子からなっている。

活性化配列は、細胞に特異的な方法で増殖する内皮細胞またはこれらの内皮細胞に隣接する細胞中で活性化される。

この活性化は、細胞サイクルに特異的な方法でプロモーターモジュールによって制御される。

活性物質は、脈管形成のインヒビターまたは細胞成長抑制または細胞毒性分子である。DNA配列をウイルスまたは非ウイルスベクターに挿入し、このベクターに活性化した内皮細胞に親和性を有するリガンドを補足する。

1. 腫瘍成長および脈管形成

多くの抗腫瘍活性を有する化合物の活性が不十分であることを、少なくともある程度までは、腫瘍結節中の腫瘍細胞が抗腫瘍化合物、特に高分子量の活性化化合物、に接近できないことによると説明することができる (Burrows et al., Pharm. Ther. 64, 155(1994), Baxter et al., Microvasc. Res. 41, 5 (1991))。このような活性化化合物が、それぞれ個々の腫瘍細胞に到達するには、血管内皮および基底膜を通り、腫瘍支質および腫瘍実質を通して拡散しなければならない。この拡散の程度は、本質的には活性化化合物の濃度また濃度勾配およびその物理化学的特性によって決定される。更に、腫瘍内部では高圧によって外側に向う対流が

、
拡散に反対する (Burrows et al., Microvasc. 41, 5(1991))。

腫瘍血管は高分子量の活性化化合物にも触れることができるので、その結果、腫瘍によって誘導される脈管形成を用いて腫瘍の治療を行うことが初期に提案された (Denekamp, Prog. Appl. Microcirc. 4, 28(1984), Denekamp, Cancer Topics

, 6, 6(1986), Denekamp, Cancer Metast. Rev. 9, 267(1990), Denekamp, Brit. J. Radiol. 66, 181(1993))。

従って、脈管形成を阻害する物質を用いて腫瘍成長を抑制することが試みられた(Bicknell et al., Semin. Cancer Biol. 3, 399(1992))。動物実験による検討では、脈管形成を阻害する物質を全身投与することによって、腫瘍の増殖を抑制することもできることが示された。これは、例えばスラミン(Gagliardi et al., Cancer Res. 52, 5073(1992))、ヘパリン/ステロイド抱合体(Thorpe et al., Cancer Res. 53, 3000(1993))、O- (クロロアセチルカルバモイル) フミジロール(Yamaoka et al., Cancer Res. 53, 4262(1993))、アンジオゲニンに対するモノクローナル抗体(Olson et al., Cancer Res. 54, 4576(1994))およびアンジオスタチン(O'Reilly et al., Cell 79, 315(1994))に適用される。

しかしながら、上記の方法は、脈管形成阻害剤の全身的な非腫瘍特異性効果、その副作用、および治療を一旦中断したときに起こる新たな腫瘍の成長の危険性といった不都合があった。

代替法としては、内皮細胞に損傷を与えて、腫瘍を壊死させることによって腫瘍の血液供給を阻害する方法が考えられた(Denekamp, Brit. J. Radiol. 66, 181(1993))。このアイデアを考慮した、毒素、細胞成長抑制剤または抗体に結合させる同位元素の投与が提案された。これらの抗体は腫瘍に関連した血管内皮に特異的である。抗体抱合体が、腫瘍に関連した血管を内皮に特異的な方法で破壊することによって腫瘍の壊死を誘発することを意図したものであった(Burrows et al., Pharma Ther. 64, 155(1994))。

また、トロンボゲン物質、サイトカインまたはケモカインを特異抗体によって腫瘍関連内皮細胞に結合させ、血液凝固、これによって誘導される炎症または免疫制御によって腫瘍成長に影響を与えることも示唆された。同様の効果が、内皮細胞を形質導入して、炎症性または免疫調節物質または腫瘍細胞の成長に影響を与える物質を分泌するDNAを有する内皮細胞に特異的な抗体によって内皮細胞にDNAを導入する提案によって、探索された(Burrows et al., Pharmac. Ther. 64, 155(1994))。

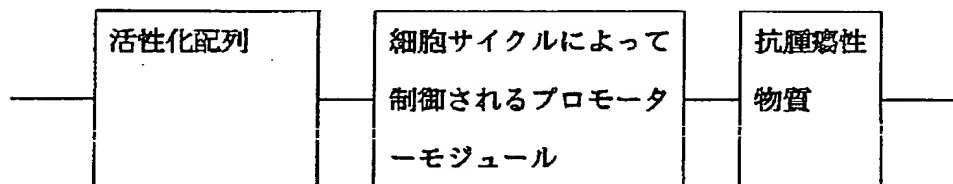
内皮細胞の表面の膜抗原、この主の抗体に対する抗原として提案された。これらの抗原としては、例えばエンドグリン、エンドシアリン、p96二量体、VEGFレセプター、PDGFレセプター、ウロキナーゼ(uPA)レセプター、および各種の付着分子が挙げられる(Burrows et al., Pharmac. Ther. 64, 155(1994))。

しかしながら、これら総ての膜抗原が有する特徴は、これらが非増殖内皮細胞にも、少なくとも比較的低濃度で存在することである。非増殖内皮細胞は、腫瘍に侵された生物でも増殖内皮細胞より遥かに多いので、この抗体抱合体を投与することによって求める効果の必要な腫瘍特異性が適当に確保されない。

2. 活性化合物の説明

本発明は、活性化合物(すなわち、医薬)であって、腫瘍患者に局所および全身投与を行うことができ、かつ腫瘍成長の部位において、独占的にではないにしても支配的に、増殖する内皮細胞を生じ、比較的長期間に亘って脈管形成が抑制され、炎症が誘発されまたは細胞成長抑制物質が直接または間接的に生成し、これによって腫瘍の成長を抑制するものに関する。

この活性化合物の中心成分は、下記の要素からなるDNA構築物である。



(本出願の明細書では、DNAは相補性(cDNA)およびゲノムDNA配列についての共通用語として用いる。)

2.1 活性化配列の選択

活性化配列は、ヌクレオチド配列(プロモーター配列またはエンハンサー配列)であって、内皮細胞または増殖する内皮細胞の直ぐ近くにある細胞中で形成されまたは活性を有する転写因子が相互作用を行うものと理解すべきである。 a)

内皮細胞で活性化される活性化配列

CMVエンハンサー、CMVプロモーター (EP0173, 177, B1)

、SV40プロモーター、または当業者に知られている任意の他のプロモーター配列またはエンハンサー配列は、活性化配列として用いることができる。しかしながら、本発明の意味では、好ましい活性化配列としては、特に内皮細胞（または増殖する内皮細胞の直ぐ近くの細胞）で検出することができるタンパク質をコードする遺伝子由来の遺伝子制御配列または要素が挙げられる。

これらのタンパク質の幾つかは、Burrows et al. (Pharmac. Therp. 64, 155(1994)) および Plate et al. (Brain Pathol. 4, 207(1994))によって記載されている。これらの内皮細胞特異タンパク質の特定の例は、下記の通りである。

脳特異性内皮グルコース-1-輸送体

脳の内皮細胞は、この輸送体を強力に発現させて、D-グルコースを内皮を介して脳に輸送する上で重要である (Gerhart et al., J. Neurosci. Res. 22, 464(1989))。このプロモーター配列は、Murakami et al. (J. Biol. Chem. 267, 9300(1992))によって記載されている。

エンドグリン

エンドグリンは、TGF β の非シグナル伝達レセプターであると思われる (Gougos et al., J. Biol. Chem. 265, 8361(1990), Cheifetz, J. Biol. Chem. 267, 19027(1992), Moren et al. BBRC 189, 356(1992))。通常の内皮では少量存在するが、増殖する内皮では多量に発現される (Westphal et al., J. Invest. Dermatol. 100, 27(1993), Burrows et al., Pharmac Ther. 64, 155(1994))。プロモーター配列は Bellon et al. (Eur. J. Immunol. 23, 2340(1993)) および Ge et al. (Gene 138, 201(1994))によって記載されている。

VEGFレセプター

2個のレセプターが識別されている (Plate et al., Int. J. Cancer 59, 520(1994)):

* VEGFレセプター1 (flt-1)

(de Vries et al., Science 255, 989 (1992))

(細胞質部分に fms 様チロシンキナーゼを含む)、および

* VEGFレセプター2 (flt-2)

(Terman et al., BBRC 187, 1579(1992))

(細胞質部分にチロシンキナーゼを含む)

これらのレセプターは、内皮細胞上にほぼ独占的に見られるものである(Senger et al., Cancer Metast. Rev. 12, 303(1993))。

他の内皮特異性レセプターチロシンキナーゼ

* t i l - 1 または t i l - 2

(Partanen et al., Mol. Cell Biol. 12, 1698(1992), Schnuerch and Ri
sau, Development 119, 957(1993), Dumont et al., Oncogene 7, 1471(1992))

* B 6 1 レセプター (E c k レセプター)

(Bartley et al., Nature 368, 558(1994), Pandey et al., Science 268, 567(1995), van der Geer et al., Ann. Rev. Cell Biol. 10, 251(1994))

B 6 1

B 6 1 分子は、B 6 1 レセプターのリガンドを表す

(Holzman et al., J. Am. Soc. Nephrol. 4, 466(1993), Bartley et al.,
, Nature 368, 558(1994))

エンドセリン、特に

* エンドセリン B

(Oreilly et al., J. Cardiovasc. Pharm. 22, 18(1993), Benatti et al
, J. Clin. Invest. 91, 1149(1993), O'Reilly et al., BBRC 193, 834 (1993))

プロモーター配列はBenatti et al., J. Clin. Invest. 91, 1149 (1993
) によって記載されている。

* エンドセリン 1

(Yanasigawa et al., Nature 332, 411(1988))

プロモーター配列はWilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4654 (1990)
によって記載されている。

エンドセリンレセプター、特にエンドセリン B レセプター

(Webb et al., Mol. Pharmacol. 47, 730(1995), Haendler et al. J. Card

iovasc. Pharm. 20, 1(1992))

マンノース-6-リン酸レセプター

(Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 225 (1994))

プロモーター配列は、Ludwig et al. (Gene 142, 311(1994)), Oshima et al. (J. Biol. Chem. 263, 2553(1988)) および Pohlmann et al. (PNAS USA

A 84, 5575(1987))によって記載されている。

von Willebrand因子

プロモーター配列は Jahroudi and Lynch (Mol. Cell. Biol. 14, 999(1994)), Ferreira et al., Biochem. J. 293, 641(1993) および Aird et al., PNAS USA 92, 4567(1995))によって記載されている。

IL-1 α および IL-1 β

IL-1は活性化した内皮細胞によって産生される (Warner et al., J. Immunol. 139, 1911(1987))

プロモーター配列は、Hangen et al., Mol. Carcinog. 2, 68(1986), Turner et al., J. Immunol. 143, 3556(1989), Fenton et al., J. Immunol. 138, 3972(1987), Bensi et al., Cell Growth Diff. 1, 491(1990), Hiscott et al., Mol. Cell. Biol. 13, 6231 (1993) および Mori et al., Blood 84, 1688(1994))によって記載されている。

IL-1レセプター

プロモーター配列は、Ye et al., PNAS USA 90, 2295 (1993) によって記載されている。

血管細胞付着分子 (VCAM-1)

内皮細胞でのVCAM-1の発現はリポ多糖類、TNF- α (Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558(1995)), IL-4 (Iademaro et al., J. Clin. Invest. 95, 264(1995)), IL-1 (Marni et al., J. Clin. Invest. 92, 1866 (1993))によって活性化される。VCAM-1のプロモーター配列は、Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558(1995), Ahmad et al., J. Biol. Chem. 270, 8976(1995), Neish et al., J. Exp. Med. 176, 1583(1992), Iademaro et al.

., J. Biol. Chem. 267, 16323 (1992) および Cybulsky et al., PNAS USA 88, 7859 (1991) によって記載されている。

合成活性化配列

天然内皮特異性プロモーターの代替物として、内皮細胞中で優先的または選択的な活性を有する転写因子のオリゴマー化した結合部位からなる合成活性化配列を用いることもできる。このような転写因子の一例は転写因子 GATA-2 であり、エンドセリン 1 遺伝子における結合部位は 5' -TTATCT-3' である (Lee et al., Biol. Chem. 266, 16188(1991), Dorfmann et al., J. Biol. Chem. 267, 1279(1992) および Wilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4854(1990))。

b) 活性化した内皮細胞に近接した細胞で活性化した活性化配列

増殖する内皮では、近接している細胞が、解放している緊密な接合部を介して血液の巨大分子に接近する。機能的および解剖学的相互関係の結果、活性化した内皮細胞の隣接細胞が本発明の意味における標的細胞である。

V E G F

V E G F は、特に低酸素条件下で、増殖する内皮細胞の直ぐ近くの各種細胞 (例えば、平滑筋細胞および腫瘍細胞) によって形成される (Ferrara et al., Endoc. Rev. 13, 18(1992), Berse et al., Mol. Biol. Cell 3, 211(1992), Finkenzeller et al., BBRC 208, 432(1995), Tischer et al., BBRC 165, 1198(1989), Leung et al., Science 246, 1306(1989))。V E G F 遺伝子の遺伝子制御配列は、下記の通りである。

・ V E G F 遺伝子のプロモーター配列 (5' -隣接領域)

(Michenko et al., Cell Mol. Biol. Res. 40, 35(1994), Tischer et al., J. Biol. Chem. 266, 11947(1991)) または

・ V E G F 遺伝子のエンハンサー配列 (3' -隣接領域)

(Michenko et al., Cell Mol. Biol. Res. 40, 35(1994)、または

・ c - S r c 遺伝子

(Mukhopadhyay et al., Nature 375, 577(1995), Bonham et al., Oncogene 8, 1973), Parker et al., Mol. Cell. Biol. 5, 831(1985), Anderson et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1122(1985)), または

・V-S r C遺伝子

(Mukhopadhyay et al., Nature 375, 577(1995), Anderson et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1122(1985), Gibbs et al., J. Virol. 53, 19(1985))

ステロイドホルモンレセプターおよびそれらのプロモーター要素(Truss and Beato, Endocr. Rev. 14, 459, (1993)), 特に

・マウス哺乳動物腫瘍ウイルスプロモーター

大半の細胞において、このプロモーターは、ステロイド、例えば糖質コルチコイド(Parks et al., Cell 8, 87(1976))またはプロゲステロン(Cato et al., EMBO J. 5, 2237(1986))によって活性化される。MMTVの長期反復領域のプロモーター領域のcDNA配列は、Chalepakis et al., Cell 53, 371(1988)およびTruss and Beato(Endocr. Rev. 14, 459(1993))によって記載されている。

2.2 リプレッサーモジュールの選択

一例として、細胞サイクルによって制御されるプロモーターモジュールは、ヌクレオチド配列CDE-CHR-Inrであると理解すべきである(下記参照)。このプロモーターモジュールの本質的機能は、細胞サイクルのG₀/G₁相における活性化配列の機能を抑制し、S/G₂相および続いて増殖細胞における細胞サイクル特異発現を開始することである。

プロモーターモジュールCDE-CHR-Inrは、ヒトcdc25CプロモーターのG₂特異性発現の詳細な研究に関連して見いだされた。出発点は、細胞サイクルのG₁相におけるプロモーターの遮断に関与するリプレッサー要

素(細胞サイクル依存性要素; CDE)を見いだしたことであった(Lucibelloら, EMBO U. 14, 132(1995))。ゲノムジメチル硫酸(DMS)フットプリント法および機能分析法(functional analyses)(第1および2図)を用いて、CDEはG₁に特異的にリプレッサー(CDE結合因子; CDF)に結合することによって非増殖(G₀)細胞に転写阻害を生じることを示すことができ、基底プロモ-

ター (basal promoter) の領域に配置されている CDE は、その抑制機能において、上流の活性化配列 (UAS) によって変化する。これにより、CDE 結合因子は、細胞サイクル依存的に、すなわち非増殖細胞および細胞サイクルの G1 相において、5' に結合した活性化物質タンパク質の転写活性化作用を阻害するという結論が得られた (第3図)。

この結論を更に実験によって確かめることができ、ウイルス性の非細胞サイクルによって制御される初期の SV40 エンハンサーを cdc25 最小プロモーター (minimum promoter) (CDE および 3' 位の開始部位) と融合することによって、キメラプロモーターの細胞サイクルが明確に制御された (第4図)。次に cdc25C エンハンサーについて検討したところ、細胞サイクル依存的に CDF によって制御される転写因子は、NF-Y (同義: CBF; Dorn et al., Cell 50, 863(1987), van Hijisduijnen et al., EMBO J. 9, 3119(1990), Coustry et al., J. Biol. Chem. 270, 468(1995)), Sp1 (Kadonaga ら, TIBS 11, 10(1986)、および新規でありかつ CBS7 に結合する転写因子であることが明らかになった。この研究において得られたもう一つの興味ある知見は、cdc25C エンハンサー内の NF-Y のみが、少なくとも 1 種類の他の NF-Y 複合体または CIF と協同して効率的に転写を活性化することが見られたことである。NF-Y も Sp1 も両方ともグルタミン含量の高い活性化物質のクラスに属し、抑制の機構 (例えば、特定の基底転写因子または TAF との相互作用または干渉) に対する重要な情報を提供する。

cdc25C、サイクリン A および cdc2 のプロモーター配列を比較したところ、幾つかの領域で相同性が見られた (第5図)。3 種類のプロモーター (含まれている多様性は機能上関連はない) 総てに保存されているのは、CDE だけでなく、隣接 Y₂ ボックスも同様であった。予想されるように、これらの領域は総てイン・ビボでタンパク質結合を示し、このタンパク質結合は CDE の場合には細胞サイクル依存性であった。更に、3 種類のプロモーターは総て、CDE の突然変異によって制御解除されることも示された (第1表)。cdc25C、サイクリン A および cdc2 配列を比較したところ、直ちに CDE の 3' の領域に

著しい類似性のあることも明らかになった（細胞サイクル遺伝子相同領域；CH₂R）（第5図）。この領域は機能上はCDEと同様に重要であるが（第1表）、それはイン・ビボでのDMSフットプリント法の実験では明らかではない。これに対する可能な説明は、この因子とDNAの小さな溝(minor grooves)との相互作用である。電気泳動移動度シフト分析(EMSA)実験の結果は、CDEとCH₂Rとは一緒にタンパク質複合体であるCDFに結合することを示している。これらの観察は、グルタミン含量の高い活性化物質のCDFによって媒介される抑制は、細胞サイクルによって制御される転写において頻繁に起きる機構であることを示している。

しかしながら、cdc25Cプロモーターを制御するのに重要なものは、CDE-CH₂R領域だけでなく、基底プロモーターのヌクレオチド配列（位置<-20~>+30、第1図を参照されたい）内の開始部位（位置+1）のものでもあることは明らかである。YY-1のイン・ビトロでの結合部位を含むこの領域での突然変異(Seto およびShenk, Nature 354, 24 (1991), Usheva およびShenk, Cell 76, 1115(1994))により、完全に制御解除される。CDE-CH₂Rが基底プロモーターに近接していることを考慮すれば、その結果としてCDFは基底転写複合体と相互作用すると思われる。

2.3. 抗腫瘍物質の選択

a) 増殖の阻害

本発明の意味においては、抗腫瘍物質はまた、内皮細胞の増殖を阻害するタンパク質のDNA配列であると理解すべきである。これらのDNA配列の例は、下記の文献に挙げているDNA配列である。

網膜芽細胞腫タンパク質 (pRb = p110) またはその類似体 p107 および p120 タンパク質 (La Thangue, Curr. Opin. Cell Biol. 6, 443(1994))、

p53 タンパク質 (Privesら, Genes Dev. 7, 529(1993))、

p21 (WAF-1) タンパク質 (El-Deiryら, Cell 75, 817(1993))、

p16 タンパク質 (Serranoら, Nature 366, 704(1993), Kambら, Science

264, 436(1994), Norboriら, Nature 368, 753(1994)),

他のcdKインヒビター(Review in Pines, TIBS 19, 143(1995)),

GADD45タンパク質(Papathanasiouら, Mol. Cell. Biol. 11, 1009(1991), Smithら, Science 266, 1376(1994)),

bakタンパク質(Farrowら, Nature 374, 731(1995), Chittendenら, Nature 374, 733(1995), Kieferら, Nature 374, 736(1995))。

これらの細胞サイクルインヒビターが細胞内で速やかに不活性化されるのを防止するには、発現したタンパク質の不活性化部位に突然変異を有し、それによってこれらのタンパク質機能は損なわれない遺伝子を用いるのが好ましい。

網膜芽細胞腫タンパク質(pRb/p110)および関連のp107およびp130タンパク質は、リン酸化によって不活性化される。従って、pRb/p110 cDNA配列、p107 cDNA配列またはp130 cDNA配列であって、コードしたタンパク質のリン酸化部位をリン酸化する

ことができないアミノ酸で置換する方法で点突然変異したものを用いるのが好ましい。

Hamel et al. (Mol. Cell Biol. 12, 3431(1992))によれば、246、350、601、605、780、786、787、800および804位のアミノ酸を置換してしまうと、網膜芽細胞腫タンパク質(pRb/p110)はリン酸化することができないが、これらの置換はラージT抗原との結合活性は損なわない。例えば、pRb/p110タンパク質では、アミノ酸Thr-256、Ser-601、Ser-605、Ser-780、Ser-786、Ser-787およびSer-800はAlaで置換され、アミノ酸Thr-350はArgで、アミノ酸Ser-804はGluで置換される。

p107タンパク質またはp130タンパク質のDNA配列は、同様なやり方で突然変異される。

p53タンパク質は、細胞においてMDM2のような特殊なタンパク質に結合することによって、または脱リン酸化したC-末端セリン392によってp53をオリゴマー化することによっても不活性化される(Schikawaら, Leukemia and

Lymphoma 11, 21 (1993) およびBrown, Annals of Oncology 4, 623(1993))。
従って、セリン392を除去することによってC-末端で切断されたp53タンパク質のDNA配列を用いるのが好ましい。

b) 脈管形成阻害剤

抗腫瘍物質は、脈管形成を阻害するタンパク質のDNA配列であるとも理解すべきである。これらのタンパク質の特定の例（関連DNA配列を文献に示す）は、下記の通りである。

プラスミノゲン活性化物質インヒビター (PAI-1)

(Reilly et al., J. Biol. Chem. 265, 9570(1990), Bosma et al., J. B

iol. Chem. 253, 9219(1988))

PAI-2

(Steven et al., Eur. J. Biochem. 196, 431(1991))

PAI-3

(Steven et al., Eur. J. Biochem. 196, 431(1991))

アンギオスチチン

(O'Reilly et al., Cell 79, 315(1994), Bicknell et al., Semin. Cancer Biol. 3, 399(1992))

インターフェロン

(Dorr, Drugs 45, 177(1993), Drugs of Today 22, 597(1986), US 45 18 584, US 45 88 585)、特に

* IFN α

(Henco et al., J. Mol. Biol. 185, 227(1985), Pestka et al., Ann. Rev. Biochem. 56, 727(1987), Weismann et al., Phil. Trans. R. Soc. Lond. B299, 7(1982), Goeddel et al., Nature 290 20(1981))

* IFN β

(Sen et al., J. Biol. Chem. 267, 5017(1992), Mark et al., EP 192 811, EP 234 599, US 45 88 585)

* IFN γ

(Gray et al., Nature 295, 503(1982), Yip et al. PNAS USA 79, 1820(1982), Rinderknecht et al., J. Biol. Chem. 259, 6790(1984))

血小板因子4

(McManus et al., J. Immunol. 123, 2835(1979); Brindley et al., J. Clin. Invest. 72, 1218(1983); Deuel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4584, 1981))

IL-12

(Voest et al., N. Natl. Cancer Inst. 87, 581(1995), Wolf et al., J. Immunol. 146, 3074(1991), Gubler et al., PNAS USA 88, 4143(1991), Kobayashi et al., J. Exp. Med. 170, 827(1989), Gabler et al., PNAS 88, 4143(1991), Gately et al., J. Immunol. 147, 874(1991), Schoenhaut et al., J. Immunol. 148, 3433(1992), Wolf et al., J. Immunol. 146, 3074(1991))

TIMP-1

(Kolkenbrock et al., Eur. J. Biochem. 198, 775(1991), Faucher et al., Path. Biol. 37, 199(1989))

TIMP-2

(Kolkenbrock et al., Eur. J. Biochem. 198, 775 (1991))

TIMP-3

(Wick et al., J. Biol. Chem. 269, 18953(1994))

白血病抑制因子 (LIF)

(Pepper et al., J. Cell Science 108, 73(1995), Gough et al., Ciba Found. Symp. 167, 24(1992), PNAS USA 85, 5971(1988), Stahl et al., J. Biol. Chem. 265, 8833(1990), Rathjan et al., Cell 62, 1105(1990))

c) 細胞成長抑制性または細胞毒性タンパク質

しかしながら、抗腫瘍物質は、腫瘍に対して細胞成長抑制効果を直接または間接的に示すタンパク質のDNA配列であるとも理解すべきである。

これらのタンパク質としては、特に下記のものが挙げられる。

ペルホリン(perforin)(Linら, Immunol. Today 16, 194(1995)),

グランチーム (granzyme) (Smyth ら, Immunol. Today 16, 202(1995))、

I L - 2

(Fletscher et al., Lymphok. Res. 6, 45(1987), Matsui et al., Lymphokines 12, 1 (1985), Tanaguchi et al., Nature 302, 305(1983))

I L - 4

(Lee et al., PNAS 83, 2061(1986); Paul, Blood 77, 1859(1991), Yokota et al., PNAS USA 83, 5894(1986), van Leuven et al., Blood 73, 1142(1989), Arai et al., J. Immunol. 42, 274 (1989))

I L - 1 2

(Kobayashi et al., J. Exp. Med. 170, 827(1989), Gabler et al., PNAS 88, 4143(1991), Gately et al., J. Immunol. 147, 874(1991), Schoenhaut et al., J. Immunol. 148, 3433(1992), Wolf et al., J. Immunol. 146, 3074(1991))

インターフェロン、例えば

* I F N - α

(Henco et al., J. Mol. Biol. 185, 227(1985), Pestka et al., Ann. Rev. Biochem. 56, 727(1987), Weissmann et al., Phil. Trans. R. Soc. Lond. B299, 7(1982), Goeddel et al., Nature 290, 20(1981))

* I F N - β

(Sen et al., J. Biol. Chem. 267, 5017(1992), Mark et al., EP 192 811, EP 234 599, US 45 88 585)

* I F N γ

(Gray et al., Nature 295, 503(1982), Yip et al. PNAS USA 79, 1820(1982), Rinderknecht et al., J. Biol. Chem. 259, 6790(1984))

T N F (Porter, TibTech 9, 158 Sidhu et al., Pharmc. Ther. 57, 79(1993)), 特に

* T N F α (Beutler et al., Nature 320, 584(1986), Kriegler et al.,

Cell 53, 45(1988)、

* TNF β (Gray et al., Nature 312, 721(1984), Li et al., J. Immunol. 138, 4496(1987), Aggarwal et al., J. Biol. Chem. 260, 2334(1985)。

オンコスタチンM

(Brown et al., J. Immunol. 147, 2175(1991); Grove et al., J. Biol. Chem. 266, 18194(1991); Hamilton et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 180, 652(1991), Manlik et al., Mol. Cell. Biol. 9, 2847(1989), Kallstad et al., J. Biol. Chem. 266, 8940(1991))

d) 炎症誘発剤

抗腫瘍物質は、抗腫瘍効果の他に、適宜、炎症を促進することによって腫瘍細胞を除去するのに寄与するタンパク質のDNA配列であると理解すべきである。これらのタンパク質の特定の例は、下記の通りである。

RANTES (MCP-2)

(Schall et al., J. Immunol. 141, 1018(1988), Cell 61, 361(1990))

単球走化性および活性化因子 (MCAF)

(Zachariae et al., J. Exp. Med. 171, 2177(1990); Rollins et al., Blood 78, 1112(1991); Murakaida et al., J. Immunol. 146, 1212 a(e1991); Sica et al., J. Immunol. 144, 3034(r1990))

IL-8

(Lotz et al., J. Immunol. 148, 466(1992); Clore et al., Biochemistry 29, 1689(1990), Matsushima et al., J. Exp. Med. 167, 1883(1988), Baglioni et al., J. Clin. Invest. 84, 1045(1989), Int. J. Immunol. 17, 103(1995), Carre et al., J. Clin. Invest. 88, 1802(1992))

マクロファージ炎症タンパク質1 (MIP-1 α および MIP-1 β)

(Broxmeyer et al., J. Immunol. 147, 2586(1991); Oh et al., J. Immunol. 147, 2978(1991); Graham et al., Nature 344, 442(1990))

好中球活性化タンパク質2 (NAP-2)

(Walz, Rheum. Arthr., London(1991), Chang et al., J. Biol. Chem. 269

, 25277(1994))

IL-3

(Otsuka et al., J. Immunol. 140, 2288(1988), de Vries et al., Stem Cells 11, 72(1993), Yang et al., Blood 71, 958(1988), Cell 47, 3(1986), Phillips et al., Gene 84, 501(1989))

IL-5

(Azuma et al., Nucl. Acid Res. 14, 9149(1986); Yokota et al., PNAS 84, 7388(1987); Campbell et al., PNAS 84, 6629(1987), Azuma et al., Nucl. Acids Res. 14, 9149(1986))

ヒト白血病抑制因子 (LIF)

(Gough et al., Ciba Found. Symp. 167, 24(1992), PNAS USA 85, 5971(1988), Stahl et al., J. Biol. Chem. 265, 8833(1990), Rahtjan et al., Cell 62, 1105(1990))

IL-7

(Matzuda et al., Leuk. Lymph. 5, 231(1991), Lupton et al., J. Immunol. 144, 3592(1990), Goodwin et al., PNAS USA 86, 302(1989), Swatherland et al., Hum. Genet. 82, 371(1989))

IL-11

(Paul et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7512(1990), Teramura et al., Blood 79, 327(1992), Kawashima et al., FEBS Lett. 283, 199

(1991))

IL-13

(McKenzie et al., J. Immunol. 150, 5436(1993), Muzio et al., Blood 83, 1738(1994), McKenzie et al., PNAS 90, 3735(1993), Minty et al., Nature 362, 248(1993))

GM-CSF

(Wong et al., Science 228, 810(1985), Gough et al., Nature 309, 763(1984), Nicola et al., J. Biol. Chem. 254, 5290(1979))

G-C S F

(Nagata et al., EMBO J. 5, 575(1986), Nagata et al., Nature 319, 415 (1986), Souza et al., Science 232, 61(1986))

M-C S F

(Welte et al., PNAS 82, 1526(1985), Lu et al., Arch. Biochem. Biophys. 268, 81(1989), Kawasaki et al., Science 230, 291(1985), Suzu et al., J. Biol. Chem. 267, 4345(1992), Wong et al., Science 235, 1504(1987))

一方では、上記のサイトカインと、他方ではヒト免疫グロブリンのFc残基との間に形成する融合タンパク質のDNA配列を、本発明において活性物質として用いることもできる。この種のDNA配列およびその調製は、EPA 0464633 A1号明細書に記載されている。

e) 細胞成長抑制剤の前駆体を活性化するための酵素

しかしながら、抗腫瘍物質は、抗腫瘍性の活性化合物の前駆体を抗腫瘍活性を有する化合物に転換できる酵素のDNA配列であるとも理解すべきである。

この種の酵素は、不活性な前駆体物質（プロドラッグ）を開裂することによって、

活性な細胞成長抑制剤（薬剤）を形成し、それぞれの場合に関連のあるプロドラッグおよび薬剤は既にDeonarain et al. (Br. J. Cancer 70 786(1994)), Mullen, Pharmac. Ther. 63, 199 (1994)、およびHarris et al., Gene Ther. 1, 170(1994))によって概説されている。

例えば、下記の酵素の一つに対するDNA配列を用いる。

単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ

(Garapinら, PNAS USA 76, 3755(1979), Vileら, Cancer Res. 53, 3860(1993), Wagner ら, PNAS USA 78, 1441(1981), Moelten ら, Cancer Res. 46, 5276(1986), J. Natl. Cancer Inst. 82, 297(1990)),

帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ

(Huberら, PNAS USA 88, 8039(1991), Snoeck, Int. J. Antimicrob. Agents 4, 211(1994)),

細菌性ニトロレダクターゼ

(Michaelら, FEMS Microbiol. Letters 124, 195(1994), Bryant ら, J. Biol. Chem. 266, 4126(1991), Watanabe ら, Nucleic Acids Res. 18, 1059(1990)),

細菌性 β -グルクロニダーゼ

(Jeffersonら, PNAS USA 83, 8447(1986)),

Secale cereale由来の植物性 β -グルクロニダーゼ

(Schulz ら, Phytochemistry 26, 933(1987)),

ヒト β -グルクロニダーゼ

(Bossletら, Br. J. Cancer 65, 234(1992), Oshimaら, PNAS USA 84, 685(1987)),

ヒトカルボキシペプチダーゼ (CB)、例えば

・肥満細胞CB-A

(Reynolds ら, J. Clin. Invest. 89, 273(1992)),

・脾臓CB-B

(Yamamoto ら, J. Biol. Chem. 267, 2575(1992), Catasusら, J. Biol. Chem. 270, 6651(1995)),

細菌性カルボキシペプチダーゼ

(Hamilton ら, J. Bacteriol. 174, 1626(1992), Ostermanら, J. Protein Chem. 11, 561(1992)),

細菌性 β -ラクタマーゼ

(Rodriguesら, Cancer Res. 55, 63(1995), Hussainら, J. Bacteriol. 164, 223(1985), Conque ら, Embo J. 12, 631(1993)),

細菌性シトシンデアミナーゼ

(Mullen ら, PNAS USA 89, 33(1992), Austinら, Mol. Pharmac. 43, 380(1993), Danielson ら, Mol. Microbiol. 6, 1335(1992)),

ヒトカタラーゼまたはペルオキシダーゼ

(Ezurum ら, Nucleic Acids Res. 21, 1607(1993)),

ホスファターゼ、特に

ヒトアルカリホスファターゼ

* ヒトアルカリホスファターゼ

(Gumら, Cancer Res. 50, 1085(1990)),

* ヒト酸性前立腺ホスファターゼ

(Sharieff ら, Am. J. Hum. Gen. 49, 412(1991), Song ら, Gene 129, 291(1993), Taylorら, Nucl. Acids Res. 18, 4928(1990)),

* 5 型酸性ホスファターゼ

(Gene 130, 201(1993)),

オキシダーゼ、特に

* ヒトリシルオキシダーゼ

(Kimi ら, J. Biol. Chem. 270, 7176(1995)),

* ヒト酸性D-アミノオキシダーゼ

(Fukuiら, J. Biol. Chem. 267, 18631(1992)),

ペルオキシダーゼ、特に

* ヒトグルタチオンペルオキシダーゼ

(Chadaら, Genomics 6, 268(1990), Ishidaら, Nucl. Acids Res. 15, 10051(1987)),

* ヒト好酸性ペルオキシダーゼ

(Tenら, J. Exp. Med. 169, 1757(1989), Sahamaki ら, J. Biol. Chem. 264, 16828(1989))、

* ヒトチロイドペルオキシダーゼ

(Kimura, PNAS USA 84, 5555(1987))。

引用した酵素の分泌を促進するため、それぞれの場合にDNA配列に含まれる相同シグナル配列を、細胞外分泌を改良する異種シグナル配列に代えることができる。

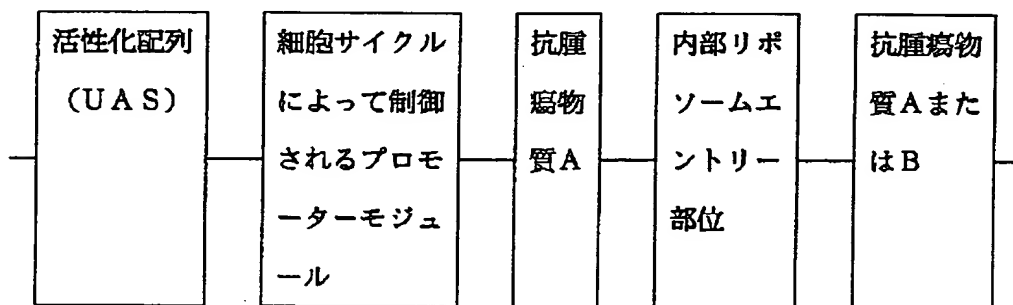
従って、 β -グルクロニダーゼのシグナル配列(DNA位置 $\leq 27 \sim 93$; Oshimaら, PNAS 84, 685(1987))を、例えばヒト免疫グロブリンのシグナル振幅(DNA位置 $\leq 63 \sim \geq 107$; Riechmann ら, Nature 332, 323(1988))に

代えることができる。

また、点突然変異の結果として、リソソームでは余り保存されない酵素のDNAを選択する方が好ましい。この種の点突然変異は、例えば β -グルクロニダーゼについて記載されている(Shipleyら, J. Biol. Chem. 268, 12193(1993))。

2.4. 数種類の抗腫瘍物質の組合せ

本発明は、活性化合物であって、幾つかの同一な活性物質(A, A)または異なる活性物質(A, B)のDNA配列の組合せが含まれているものにも関する。2個のDNA配列の発現のためには、内部リボソームエントリー部位(IRES)のcDNAは、制御要素として挿入するのが好ましい。



この種のIRESは、Mountford およびSmith (TIG 11, 179 (1995)、Kaufmanら, Nucl. Acids Res. 19, 4485(1991)、Morganら, Nucl. Acids Res. 20, 1293(1992)、およびDirksら, Gene 129, 247(1993)、Pelletier およびSonenberg, Nature 334, 320 (1988)、Sugimotoら, BioTech. 12, 694 (1994) によって記載されている。

従って、ポリオウイルスのIRES配列のcDNA(5' URTの位置 $\leq 140 \sim \geq 630$; Pelletier and Sonenberg, Nature 334, 320(1988))を用いて、抗炎症物質AのDNA(3' 末端)および抗炎症物質BのDNA(5' 末端)を連結することができる。

組み合わせ(A+A, A+B1)によっては、この種の活性化合物は本発明の意味において相加的または相乗的効果を示す。

2.5. ベクターの構築

新規DNA構築物を、当業者に慣用されている方法で完全なベクターとする。このベクターはウイルスまたは非ウイルス性のものであることができる。例えば、新規なDNA構築物をウイルスベクターに挿入し（この場合には、D.Jolly, *Cancer Gene Therapy* 1, 51 (1994) を参照されたい）、またはプラスミドとして用

いる。ウイルスベクターまたはプラスミドをコロイド状分散液、例えばリポソームと複合体を形成し(Farhood et al., *Annals of the New York Academy of Science* 716, 23(1994))、またはポリリシン／リガンド抱合体または他の慣用されている補助物質と共に医薬品として処方することもできる(Curiel et al., *Annals of the New York Academy of Science* 716, 36(1994))。

2.6. リガンドの選択

ウイルスおよび非ウイルス性ベクターは、リガンドを補足することができる。増殖する内皮細胞の表面に結合する物質は、例えばポリリシン／リガンド抱合体におけるリガンドとして好ましい。これらの物質としては、例えばBurrows et al. (*Pharmac. Ther.* 64, 155(1994))、Hughes et al. (*Cancer Res.* 49, 6214(1989))およびMaruyama et al. (*PNAS USA* 87, 5744 (1990)) によって記載されているように、内皮細胞の膜構造に対する抗体または抗体断片が挙げられる。これらの物質としては、特にVEGFレセプターに対する抗体が挙げられる。

ネズミモノクローナル抗体は、人体に適用される形態で用いるのが好ましい。人体への適用は、Winter et al. (*Nature* 349, 293(1991))およびHoogenbooms et al. (*Rev. Tr. Transfus. Hemobiol.* 36, 19(1993)) によって記載された方法で行われる。抗体断片は、当該技術分野の状況に従って、例えばWinter et al. (*Nature* 349, 293(1991))、Hoogenbooms et al. (*Rev. Tr. Transfus. Hemobiol.* 36, 19(1993))、Givol (*Mol. Immunol.* 28, 1379(1991))およびHuston et al. (*Int. Rev. Immunol.* 10, 195(1993)) によって記載された方法で調製される。更に、リガンドとしては、内皮細胞の表面上の膜構造または膜レセプターに結合する総ての物質が挙げられる。これらの物質としては、例えば、末端にマンノースを含む物質、およびIL-1または成長因子、またはそれらの断片またはそれ

らの構成配列であって、内皮細胞によって発現されるレセプター、例えばPDGF、bFGF、VEGFおよびTGF β に結合するものが挙げられる(P

usztain et al., J. Pathol. 169, 191(1993))。更に、それらとしては、活性化しおよび／または増殖する内皮細胞に結合する付着分子が挙げられる。この種の付着分子、例えばSLe^x、LFA-1、MAC-1、LECAM-1またはVLA-4は、既に記載されている(Augustin-Voss et al., J. Cell Biol. 119, 483(1992), Pauli et al., Cancer Metast. Rev. 9, 175(1990)およびHonn et al., Cancer Metast. Rev. 11, 353(1992))。

2.7. 活性化合物の調製 (実施例)

新規な活性化合物の調製を、下記の実施例によって更に詳細に説明する。

a) キメラプロモーターエンドセリン1-CDE-CHR-Inrの構築

ヒトヒトエンドセリン-1プロモーター (位置 $\leq -170 \sim \geq -10$) またはTATAボックスを除去することによって切断した変異体 (位置 $\leq -170 \sim \geq -40$) をその3'末端で、ヒトcdc25C遺伝子のCDE-CHR-Inrモジュール (位置 $\leq -20 \sim \geq +121$) の5'末端に連結する (第6図)。この連結は、当業者に知られておりかつ市販されている酵素を用いて行われる。

b) 活性化合物の中心成分を含むプラスミドの構築

上記のキメラエンドセリン-1プロモーターモジュール／転写単位を、その3'末端で、ヒト β -グルクロニダーゼの完全コード領域を含むDNA [lacuna] の5'末端に連結する (位置 $\leq -27 \sim \geq 1982$; Oshima et al., PNAS USA 84, 685(1987))。このDNAは、分泌に必要なシグナル配列 (22個のN-末端アミノ酸) をも含んでいる。細胞からの分泌を促進するため、このシグナル配列を、免疫グロブリンシグナル配列 (位置 $\leq 63 \sim \geq 107$; Riechmannら, Nature 332, 323(1988)) で置換するのが好ましい。転写制御単位および β -グルクロニダーゼのDNAを、次にpuc18/19またはBluescript由来のプラスミドベクターにクロー

ニングして、これを直接またはコロイド分散液系でイン・ビボでの投与に用いる

ことができる。或いは、キメラ遺伝子をウイルスベクターまたは他の好適なベクターに移して、注射することができる。

2.8. 活性化化合物の活性

例えば腫瘍の部位で局所投与の後、または頭蓋内またはクモ膜下投与、または全身、好ましくは静脈内または動脈内投与の後、本発明の活性化化合物は、組織特異性活性化配列 (UAS) および細胞サイクルによって制御されるリプレッサーモジュールの組み合わせによって、独占的にではないにしても主に増殖する内皮細胞だけまたはこれらの増殖する内皮細胞の隣接細胞である内皮細胞が、それ自身の増殖を阻害するまたは抗増殖または細胞成長抑制効果を有する物質の形成を誘発する物質を分泌できるようになる。内皮細胞の増殖の抑制および/または細胞成長抑制物質の放出により、腫瘍の成長が阻害される。この活性化化合物は、抗腫瘍物質の形成が新規な化合物によって腫瘍成長および主要によって引き起こされる脈管形成の部位に限定されるので、良好な耐性を有する。

活性化化合物の細胞特異性およびその細胞サイクル特異性により高度の安全性が約束されるので、これを高投与量で用い、必要ならば、数日または数週間の間隔で繰り返し用いて、腫瘍疾患の治療を行うこともできる。

第1図～第7図の説明

第1図：

イン・ビボで見いだされたタンパク質結合部位を有するcdc25Cプロモーター領域のヌクレオチド配列 (ゲノムDMS-フットプリント法；○ (黒丸)：完全な構成上の保護；○ (白丸)：部分的な構成上の保護；* (星印)：細胞サイクルによって制御されたG1に特異的な保護)。CBS：構成結合部位；CDE：細胞サイクル依存性要素。灰色に下塗した領域は、Y_cボックス (NF-Y結合部位) を示している。開始部位は、黒四角形で示す。

第2図：

cdcの突然変異によるG₀における特異的なcdc25Cプロモーターの抑制解除。

第3図：

CDEによるcdc25Cエンハンサーの制御を模式的に表したもの。

第4図：

CDEによるSV40エンハンサーのG₀/G₁特異的抑制。右の数値はG₂での誘導を示す（コントロール=1との比較）。

第5図：

cdc25C、サイクリンAおよびcdc2プロモーターでのCDE-CHR領域および5' Ycボックスにおける相同性。

第6図：

ヒトエンドセリン-1プロモーター、CDEおよびCHRリプレッサー要素を含む3' 融合プロモーターモジュール、およびエフェクターとしてのヒトβ-グルクロニダーゼのDNA（完全コード領域、位置≤239～≥2194：Oshima et al., PNAS USA 84, 685(1987)）の様々な残基からなるキメラ構築物。位置の表示は、それぞれ、エンドセリン1遺伝子に対するWilson et al., Mol. Cell Biol. 10, 4854 (1990) の表示、およびLucibello et al., EMBO J. 15, 132(1995)によって使用されたcdc25Cに対する系を表す。

第7図

免疫グロブリン（HuVHCAMP）のシグナル配列（MGWSCIIILFLVATAT）に対する位置の表示はRiedmann et al., Nature 332, (1988)によるものである。

代替：β-グルクロニダーゼの細胞外分泌を向上させるためのIgシグナルペプチドの挿入（第7B図）。

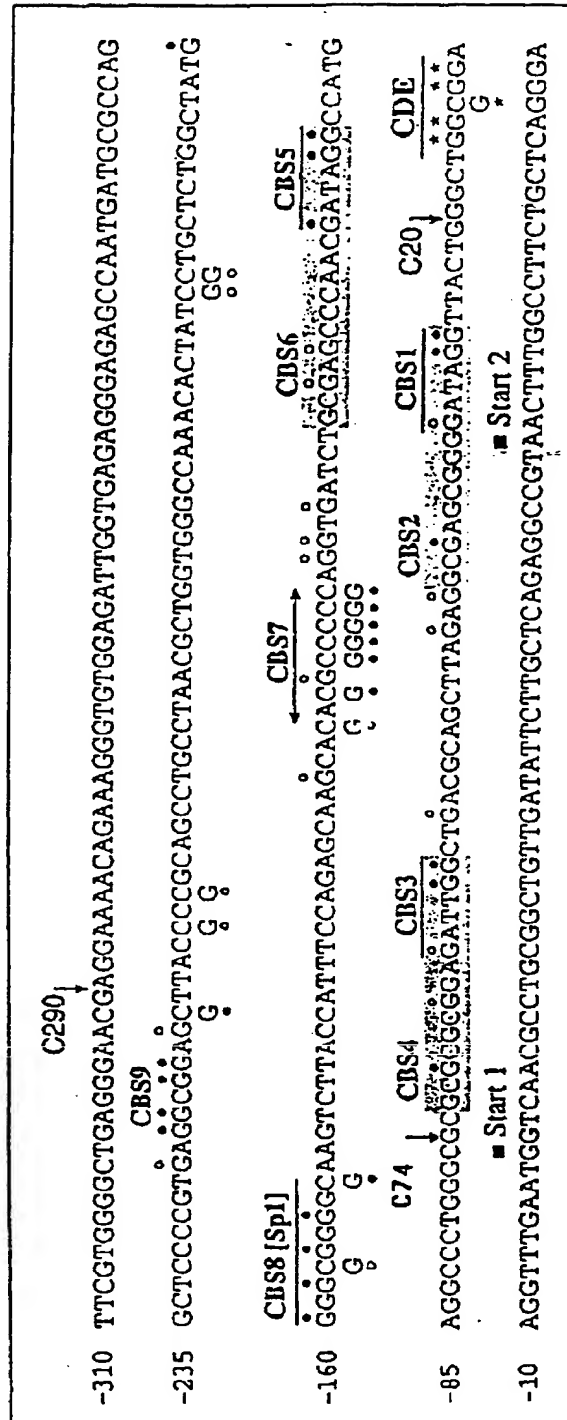
第1表: c d c 2 5 C、サイクリンAおよびc d c 2の細胞サイクル制御転写
におけるCDEおよびCHRの役割

第1表

	G ₀	成長	因子
w t			
c d c 2 5 C	0.8	13.1	17.5
サイクリンA	0.7	27.1	41.7
c d c 2	1.0	41.2	41.2
mCDE (-13)			
c d c 2 5 C	7.6	11.6	1.5
サイクリンA	13.4	23.9	1.8
c d c 2	11.3	33.9	3.0
mCHR (-6/-3)			
c d c 2 5 C	14.4	21.0	1.5
サイクリンA	15.5	28.3	1.8
c d c 2	18.6	38.6	2.1

H I H 3 T 3細胞での遷移トランスフェクションの結果は、R L U s / 1 0 0
0として表す。mCDE:突然変異したCDE (位置:-13:G→T); mC
HR:突然変異したCHR位置:-6~-3)

FIG. 1



【図2】

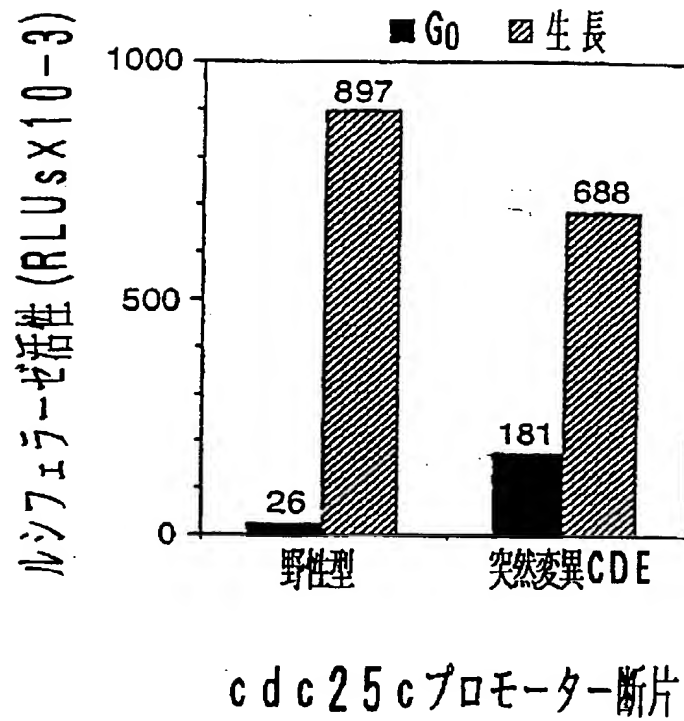


FIG. 2

【図3】

多重非特異性エンハンサー要素

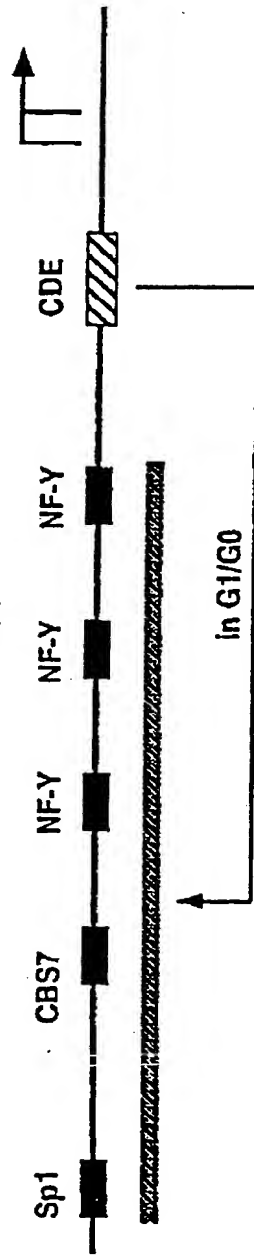


FIG. 3

G2での誘導



	Y _C -Box 2		Y _C -Box 1		
<i>cdc25C</i>	 9 bp		 8 bp		CDE - CHR
<i>cdc2</i>	 10 bp		 17 bp		CDE - CHR
<i>cyclin A</i>	 8 bp		 9 bp		CDE - CHR

ATF

FIG. 1

【図6】

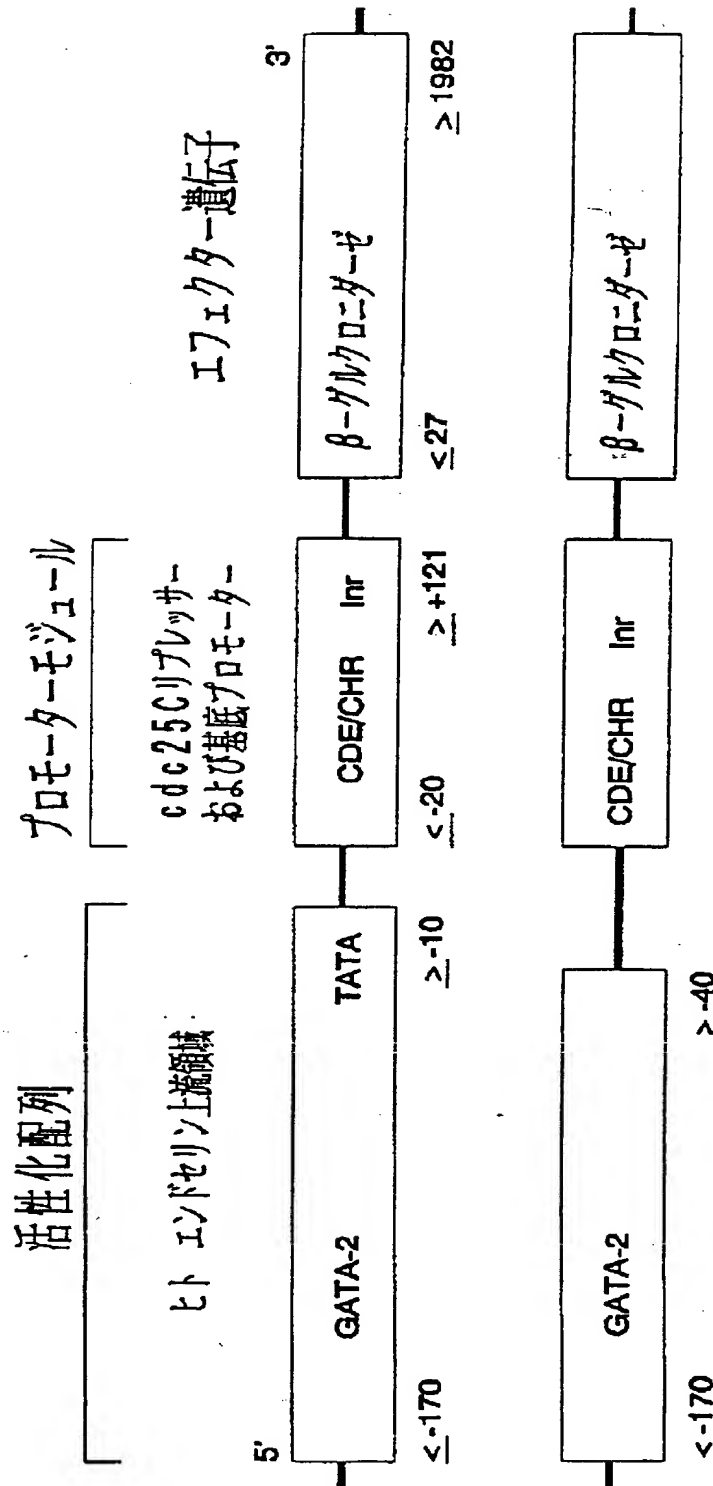


FIG. 6

【図 7】

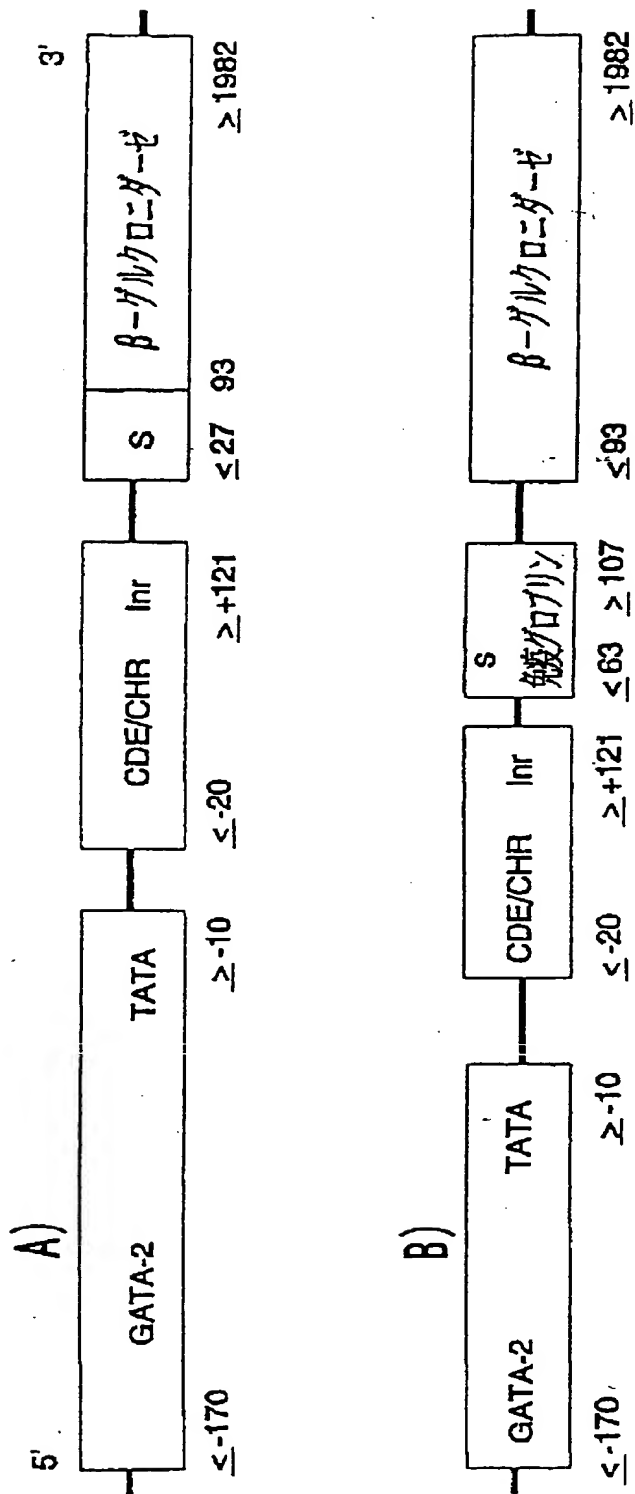


FIG. 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/cP 95/03370
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/85 A61K48/00 C12N15/86		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 13807 (GEORGETOWN UNIVERSITY) 22 July 1993 see the whole document	1,3,9, 15-18,22
X	WO,A,93 10135 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 27 May 1993 see page 18, line 21 - page 20, line 28	1,5,15, 18
P,X	WO,A,94 29469 (VICAL INCORPORATED) 22 December 1994 see examples 2-7	1,4,18, 20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 December 1995		05.01.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3916		Authorized officer Cupido, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP 95/03370

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
WO-A-9313807	22-07-93	AU-B- 3429993	03-08-93
WO-A-9310135	27-05-93	AU-A- 3063692	15-06-93
WO-A-9429469	22-12-94	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 38/44		A 6 1 K 48/00	ADU
38/55		C 1 2 P 21/02	C
39/395		A 6 1 K 37/64	
		37/66	
48/00	ADU	37/50	
C 1 2 P 21/02		37/24	
//(C 1 2 N 15/09	ZNA		
C 1 2 R 1:92)			

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, C Z, EE, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, T J, TT, UA, US, UZ, VN

PCT WELTORGANISATION FÜR GI
Internationales
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHUNG
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF D



WO 9606940A1

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/85, A61K 48/00, C12N 15/86		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/06940
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	7. März 1996 (07.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03370 (22) Internationales Anmeldedatum: 25. August 1995 (25.08.95) (30) Prioritätsdaten: 9417366.3 26. August 1994 (26.08.94) GB 9506466.3 29. März 1995 (29.03.95) GB (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BEHRINGWERKE AG [DE/DE]; Emil-von-Behring- Strasse 76, D-35041 Marburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEDLACEK, Hans-Harald [DE/DE]; Sonnenhang 3, D-35041 Marburg (DE). BOSSLET, Klaus [DE/DE]; An der Haustatt 64, D-35037 Marburg (DE). MÜLLER, Rolf [DE/DE]; Poitierstrasse 8, D-35037 Marburg (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(54) Title: GENETIC THERAPY OF TUMOURS WITH AN ENDOTHELIUM CELL-SPECIFIC ACTIVE SUBSTANCE WHICH IS DEPENDENT ON THE CELL CYCLE (54) Bezeichnung: GENTHERAPEUTISCHE BEHANDLUNG VON TUMOREN MIT EINEM ENDOTHELZELLSPEZIFISCHEN, ZELLZYKLUSABHÄNGIGEN WIRKSTOFF (57) Abstract <p>The invention concerns a DNA sequence for the genetic therapy of tumours. The essential components of the DNA sequence consist of an activator sequence, a promoter module and a gene for the active substance. The activator sequence is activated cell-specifically in proliferating endothelium cells or cells neighbouring these endothelium cells. The promoter module regulates this activation specifically according to the cell cycle. The active substance is an angiogenesis inhibitor or a cytostatic or cytotoxic molecule. The DNA sequence is introduced into a viral or non-viral vector, supplemented by a ligand having affinity for the activated endothelium cell.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es wird eine DNA-Sequenz für die Genterapie von Tumoren beschrieben. Die DNA-Sequenz besteht in ihren wesentlichen Elementen aus einer Aktivatorsequenz, einem Promotormodul und einem Gen für die Wirksubstanz. Die Aktivatorsequenz wird zellspezifisch aktiviert in proliferierenden Endothelzellen oder diesen Endothelzellen benachbarte Zellen. Diese Aktivierung wird zellzyklusspezifisch reguliert durch das Promotormodul. Die Wirksubstanz stellt einen Inhibitor für die Angiogenese oder ein zytostatisches oder zytotoxisches Molekül dar. Die DNA-Sequenz wird eingefügt in einen viralen oder nicht-viralen Vektor, ergänzt um einen Liganden mit Affinität zur aktivierten Endothelzelle.</p>			